

(19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)

(12) Unexamined Patent Gazette

(11) Japanese Patent publication (unexamined)

Hei.1-215280

(43) Publication date August 29, Heisei 1(1989)

(51) Int. C14

C 12 N 1/20

C 12 N 15/00

C 12 P 13/22

Identification mark

Reference No. office

G-8515-4B

A-8412-4B

A-7236-4B

Request for examination

no

Number of claims

8

(Complete in 10 pages)

(54) Title of the invention

Improvement in microorganism

(21) Application No.

Sho. 63-38482

(22) Application date

February 23, Sho. 63 (1988)

(72) Inventor

Kazunori Sakimoto, c/o Biochemincal Laboratory of Showa  
Denko KK, 24-25, Tamagawa 2-chome, Ota-ku, Tokyo

(72) Inventor

Kaoru Takahashi, c/o Biochemincal Laboratory of Showa  
Denko KK, 24-25, Tamagawa 2-chome, Ota-ku, Tokyo

(72) Inventor

Yoshihiro Yajima, c/o Biochemincal Laboratory of Showa  
Denko KK, 24-25, Tamagawa 2-chome, Ota-ku, Tokyo

(72) Inventor

Yumiko Hisatome, c/o Biochemincal Laboratory of Showa  
Denko KK, 24-25, Tamagawa 2-chome, Ota-ku, Tokyo

(71) Applicant

Showa Denko KK, 10-12, Shiba-Daimon 2-chome, Minato-ku,  
Tokyo

(74) Attorney

Akira Aoki (and 4 others)

## SPECIFICATION

### 1. Title of the Invention

Improvement in microorganism

### 2. Scope of Claim for Patent

1. An improved microorganism having an expression regulatory sequence for a gene concerned in the production of a target substance introduced in the chromosome of a microorganism possessing said chromosome containing said gene at a position and in a direction such that the expression of said gene is enabled to be restricted.

2. A microorganism according to claim 1, wherein said microorganism is a microorganism of genus *Bacillus*.

3. A microorganism according to claim 2, wherein said microorganism is *Bacillus subtilis* or *Bacillus amyloliquefaciens*.

4. A microorganism according to any of claims 1 through 3, wherein said expression regulatory sequence is a promoter and said promoter is inserted in the upstream of said gene.

5. A microorganism according to claim 4, wherein said promoter is the promoter of a microorganism of genus *Bacillus* or the promoter of a phage of a microorganism of genus *Bacillus* and said promoter is inserted in the upstream of said gene.

6. A microorganism according to any of claims 1 through 5, wherein said gene is a gene concerned with the synthesis of tryptophan.

7. A method for the production of an improved

microorganism, characterized by introducing an expression regulatory domain for a gene concerned in the production of a target substance in the chromosome of a microorganism possessing said chromosome containing said gene at a position and in a direction such that the expression of said gene is enabled to be enhanced.

8. A method for the production of a useful substance, characterized by culturing an organism set forth in claim 1 thereby yielding a product concerned in said gene and collecting said product.

### 3. Detailed Description of the Invention

#### [Field of the Invention]

This invention relates to a novel method for improving a useful microorganism, a microorganism produced by the method for improvement, and a method for the production of a useful substance by the use of the microorganism. The method for improving a microorganism according to this invention is characterized by introducing externally an expression regulatory sequence capable of controlling the expression of the gene into a chromosome containing an existent gene.

#### [Prior Art]

The recombinant DNA technology has developed and advanced to the extent of permitting mass production in microorganisms of substances ranging from such proteins as hormones, vaccines, and interferons, and enzymes and amino acids through secondary metabolites such as vitamins and antibiotic substances. This mass production is accomplished

by converting a specific gene concerned in the production of a substance into a clone on an appropriate plasmid vector of a large number of copies, introducing the plasmid by the method of transformation into an appropriate microorganism, and inducing expression of the introduced gene concerned in the production of a substance. In this case, the expression of the gene is performed more efficiently by functionally connecting a promotor gene to a target gene by the use of a plasmid vector possessing a promotor gene of high activity. The production of a substance by the use of a plasmid vector is generally unstable and unsuitable for stable manufacture of a substance because it suffers the plasmid to fall out or to succumb to variation or deletion.

As an alternative measure, the method which comprises integrating a target gene with the chromosome of a host microorganism is conceivable. Though this method is capable of stably maintaining the externally introduced gene through a multiplicity of generations, it has the disadvantage of encountering difficulty in increasing the degree of amplification of the gene and inevitably imposing a limit on the productivity of the target product.

[Problem to be solved by the Invention]

An earnest demand, therefore, has been continuing for a microorganism which stably maintains a gene concerned with a target substance in the chromosome thereof, powerfully expresses the gene, and allows efficient production of the target substance and a method ~~for the creation of the~~

microorganism.

[Means to solve the Problem]

The present inventors have continued various studies with a view to solving the problem mentioned above and consequently discovered that a microorganism capable of efficiently producing a specific target substance is obtained by introducing a powerful promotor capable of enhancing the expression of a gene concerned in the production of the target substance in the chromosome of a microorganism already containing the gene. The present invention has been perfected as a result.

This invention, therefore, is aimed at providing an improved microorganism which has an expression regulatory sequence for a gene concerned in the production of a target substance introduced in the chromosome of a microorganism possessing the chromosome containing the gene at a position and in a direction such that the expression of the gene is enabled to be controlled; a method for the production of the microorganism; and a method for the production of a useful substance, characterized by culturing the organism thereby yielding a product concerned in the gene and collecting the product.

[Specific Description]

This invention can be applied to a microorganism which already possesses a gene concerned in the production of a target substance in the chromosome thereof and exhibits the ability to produce the target substance and to a microorganism

which already possesses a gene concerned in the production of a target substance in the chromosome thereof and nevertheless fails to produce substantially the target substance and derives an ability to produce the target substance from externally introducing anew an expression regulatory gene. As concrete examples of the microorganism answering this description, the microorganisms belonging to genus *Bacillus*, genus *Escherichia*, genus *Serratia*, genus *Pseudomonas*, genus *Brevibacterium*, genus *Corynebacterium*, etc., may be cited. The microorganisms which belong to genus *Bacillus* include *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, etc., for example.

The target substances which are produced by the method of this invention can be proteins or polypeptides such as, for example, varying species of enzymes such as, for example, protease, amylase, glucose isomerase, cellulase, and tryptophan synthetase which are products of direct expression of genes; various species of peptide-like hormones such as, for example, insulin, growth hormones, encephalin, and somatostatin; various species of antigens such as, for example, hepatitis vaccine, polio vaccine, and Herpes vaccine; and various species of lymphokine such as, for example, interferon and interleucine.

The target substances which are produced by the method of this invention can also be such substances as are produced by the catalytic activity of one or more enzymes which are products of direct expression of genes. As concrete examples

( )

of such substances, L-tryptophan which is synthesized by a plurality of enzymes concerned in the synthesis of tryptophan, L-threonine which is synthesized by a plurality of enzymes concerned in the synthesis of threonine, and inosine and guanine which are synthesized by a plurality of nucleotide-synthesizing enzymes may be cited. The gene which is concerned in the production of such target substance may be a gene which inherently exists in the chromosome of a host microorganism or a gene which has been artificially inserted in advance in the chromosome of a host microorganism. The former gene possesses an expression regulatory ~~series~~ naturally attendant on the gene and, on being furnished with an additional expression regulatory sequence to be inserted therein by the method of this invention, acquires an ability to enhance the production of the target substance by a host. It is otherwise capable of conferring an ability to produce the target substance on a host which has been inherently incapable of producing substantially the target substance. The latter gene in most cases possesses an expression regulatory domain attendant on the structural gene thereof and, on being furnished with a powerful expression regulatory sequence to be introduced by the method of this invention, acquires such effect as mentioned above. When the preparatorily inserted gene is not accompanied by the expression regulatory sequence of its own, the host microorganism in its unmodified form is incapable of producing the target substance. It is, however, enabled to confer an



ability to produce the target substance on the host microorganism by artificially inserting an expression regulatory sequence therein by the method of this invention. As a concrete example of the microorganism which contains such gene, a microorganism which is created by subjecting a gene concerned in the synthesis of the tryptophan of *Bacillus subtilis* and a chloramphenicol-resistant gene to in vitro ligation thereby inducing integration of the two genes in the chromosome of *Bacillus subtilis* and which allows stable production of the products of the two genes and tryptophan (JP-A-61-85,184 and JP-A-61-88,873) may be cited.

The expression regulatory sequences include promoters, terminators, SD sequences, and operators, for example. They are inserted as oriented in alignment with the direction of transfer of the structural gene into the upstream or downstream of a structural gene concerned in the production of the target substance which normally exist already in the relevant chromosomes, depending on a specific expression regulatory sequence. A typical example of the regulatory sequence mentioned above is a promotor. This promotor is generally inserted in the upstream of the structural gene mentioned above as oriented in alignment with the direction of transcription of the structural gene. For a specific host microorganism, for example, the product obtained by converting a promotor naturally existing in the microorganism into a clone, the product obtained by converting a promotor naturally existing in a phage of the microorganism into a clone, or the

hybrid promotor originating in these promotors can be used. The promotor may have been chemically synthesized.

Generally, the expression regulatory domain to be inserted is introduced either by a plasmid capable of being amplified in a host microorganism or in the form of a cyclic or linear DNA incapable of being amplified in the host microorganism. As a means for introducing the target DNA into the host microorganism, any of the methods in popular use for the introduction of a DNA into cells such as, for example, the calcium cell method (literature: J. Bacteriol., 119, 1072 (1974)), competent cell method (literature: Gene, 1, 153 (1977)), the protoplast transformation method (Molec. Gen. Genet. 168, 111 (1979)) can be used.

As a means for integrating an expression regulatory sequence such as a promotor with the chromosome of a host microorganism, the so-called homologous crossing-over is adopted. For this purpose, the regulatory sequence to be inserted is preferred to be furnished at one terminal or both terminals thereof with a DNA sequence which is homologous with the DNA sequence of a gene already existing in the relevant chromosome and concerned in the formation of the target product.

The working examples, as cited hereinafter in the present specification, uses *Bacillus amyloliquefaciens* as a host microorganism, a gene constructing tryptophan operon as a gene concerned in the production of a target substance, and a promotor originating in *Bacillus amyloliquefaciens* or a

promotor originating in SP02 phase infecting *Bacillus subtilis* as an expression regulatory sequence. These concrete examples will be referred to hereinafter as working examples.

The enzyme reaction conditions involved in the working examples are roughly as follows.

Hind III digestion

Reaction medium: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM

NaCl, 5 mM HgCl<sub>2</sub>,

Amount of enzyme: 5 units per 1 µg of DNA

Reaction conditions: 60 minutes at 37°C

Hind III partial digestion

Reaction medium: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM

NaCl, 5 mM NgCl<sub>2</sub>,

Amount of enzyme: 0.1 unit - 1 unit per 1 µg of DNA

Reaction conditions: 60 minutes at 37°C

Sma I digestion

Reaction medium: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM KCl,

7 mM NgCl<sub>2</sub>,

Amount of enzyme: 10 units per 1 µg of DNA

Reaction conditions: 60 minutes for 37°C

Xba I digestion

Reaction medium: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM

NaCl, 5 mM HgCl<sub>2</sub>,

Amount of enzyme: 5 units per 1 µg of DNA

Reaction conditions: 60 minutes at 37°C

EcoR I digestion

Reaction medium: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM

HaCl, 5 mM HgCl<sub>2</sub>

Amount of enzyme: 5 units per 1 µg of DNA

Reaction conditions: 60 minutes at 37°C

#### BamH I digestion

Reaction medium: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM

HaCl, 5 mM HgCl<sub>2</sub>

Amount of enzyme: 10 units per 1 µg of DNA

Reaction conditions: 60 minutes at 37°C

#### DNA polymerase I

##### Klenow fragment

(pol I) treatment: One (1) µg of DNA (20 µl) digested in a buffer of 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 3 units (1 µl) of a DNA polymerase I-Klenow fragment and 2 n moles (1 µl of 2 mM solution) of a relevant dXTP added thereto were incubated at room temperature for 30 minutes.

#### Bacterial alkaline phosphatase (BAP)

Treatment: One (1) µg of a DNA solution digested with a restriction enzyme and 0.3 unit of BAP added thereto were incubated at 55°C for 30 minutes.

Connection by T4 DNA ligase: Separate portions of DNA solution digested in a buffer of 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5 mM HgCl<sub>2</sub>, were combined, diluted with ATP to a total amount of 10 µM, and further made to add 30 units of T<sub>4</sub> DNA ligase, and the resultant mass was incubated overnight at 15°C.

#### Example 1. Cloning of promotor from Bacillus

amyloliquefaciens and impartation of marker (Fig. 1)

First, a promotor screening vector pGR71 (Nature, 293, 309 (1981) Goldfarb. D. S. et al.) (widely used in the trade and easily procured) was digested with a restriction enzyme Hind III. The product of digestion thus obtained and the chromosome DNA of *Bacillus amyloliquefaciens* similarly digested with the restriction enzyme Hind III were mixed in a test tube and subjected to a ligation reaction by the use of T4 DNA ligase. Then, the product of ligation was introduced into *Bacillus subtilis* UOT 0531 (Tokyo University, Applied Microorganism Research Institute) by the protoplast transformation method (S. Chang & S. N. Cohen, Molec. gen. Genet., 168, 111 (1979)) to obtain numerous transformed particles capable of growing on an agar culture plate containing 25 ppm of chloramphenicol. Then, the transformed particles were tested for degree of resistance to chloramphenicol and for the chloramphenicol acetyl transferase activity. The transformed particles, *Bacillus subtilis* TFK 756, which exhibited the highest activity were selected as a strain having a promotor of high activity cloned. The plasmid was separated from the TFK 756 and refined. The Hind III fragment DNA already cloned and measured 0.3 MD in size was designated as sequence P756 possessing a promotor activity and the pGR 71 fragment having P756 cloned was designated as pSDK 756.

Then, for the purpose of incorporating a tetracycline-resistant gene as a marker in the upstream of the P756 promotor of pSDK 756, the plasmid pTP 5 of *Bacillus subtilis*

was digested with the restriction enzyme Hind III. The product of this digestion and the pSDI 756 partially digested similarly with the restriction enzyme Hind III were mixed and subjected to a ligation reaction by the use of the Td DNA ligase and transformed to escherichia coli C600 to obtain a transformed body which exhibited resistance to tetracycline and assumed resistance to chloramphenicol. Consequently, a plasmid pSDK 27364 having 1.5 MD of tetracycline-resistant gene incorporated in the upstream of P. 756 of the pSDK 756 was produced.

Further, the pSDK 27364 was partially digested with the restriction enzyme Hind III and caused to form smooth terminals by the use of Klenow fragment and four species of XTP as shown in Fig. 1. Then, it was mixed with the pUC 18 digested with Sma I and subjected to dephosphorization-oxidation with BAP and the resultant mixture was ligated with the Td DNA ligase and transformed to an escherichia coli JN 109 to screen transformed particles containing the plasmid pSDK 27365 and exhibiting resistance to Ampicillin and tetracycline. As a result, the plasmid capable of preparing a DNA fragment possessing a P756 furnished with a marker resistant to tetracycline was obtained.

Example 2. Preparation of DNA for introduction of promotor P. 756 and introduction thereof to host strain (Fig. 2)

The plasmid pSDK 27365 was digested with EcoRI and Xba I, separated by agarose electrophoresis, and refined by phenol extraction and ethanol precipitation to produce 1.8 MD of

EcoRI-Xba I fragment containing a gene resistant to tetracycline and the promotor P 756.

Separately, the plasmid pSDT IIII having the tryptophan synthesizing gene of *amyoliquefaciens* cloned to the *escherichia coli* plasmid pBR 322 was digested with the restriction enzyme EcoR I and Xba I, separated by agarose gel electrophoresis, and refined by phenol extraction and ethanol precipitation to obtain the EcoR I - Xba I fragment containing the upstream portion of the tryptophan synthesizing gene and measuring 2.5 MD in size. The *escherichia coli* containing the plasmid pSDT IIII has been deposited as FERMP-7861 in Microorganism Industrial Technology Research Institute of Industrial Science and Technology Agency.

Then, the two fragments in equal amounts of about 1  $\mu$ g were mixed and subjected to a ligating reaction by the use of the T4 DNA ligase. The product of this reaction was used to transform the competent cells of the tryptophan producing *bacillus* SD 30 of *Bacillus amyoliquefaciens* as follows.

First, the *bacillus* SD 30 scribble cultured on a TBAD agar culture medium (Difco Corp.: 10 g of Bacto Tryptose, 3 g of Bacto Beef Extract, 5 g of NaCl, 15 g of Bacto Agar: 1 liter of  $H_2O$ ) was inoculated in such an amount to the CI culture medium (14 g of  $K_2PO_4$ , 6 g of  $KH_2PO_4$ , 2 g of  $(NH_4)_2SO_4$ , 1 g of sodium citrate $\cdot$ 2 $H_2O$ , 6 mM of  $MgSO_4\cdot 7H_2O$ , 5 g of glucose, 0.2 g of Casamino acid, 50 ppm of L-tryptophan: 1 liter of  $H_2O$ ) as to set the OD 660 at 0.05, shaken cultured at 37°C, and subjected to centrifugation (4000 rpm, 10 minutes) when

the OD 660 reached a level of about 0.5. The precipitate was suspended in such an amount in the C II culture medium (14 g of  $K_2PO_4$ , 6 g of  $KH_2PO_4$ , 2 g of  $(NH_4)_2SO_4$ , 1 g of sodium citrate- $2H_2O$ , 0.5 mM of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 5 g of glucose, 0.1 g of Casamino acid, and 5 ppm of L-tryptophan) so as to be diluted to twice the original volume. The mixed culture medium consequently formed was continuously shaken cultured and, 30 minutes thereafter, admixed with the DNA solution which had undergone a ligation reaction, shaken cultured for one hour at  $37^\circ C$ , and applied to the TBAB agar culture medium containing 5 ppm of tetracycline.

After the culture was performed overnight at  $37^\circ C$ , transformed particles resistant to tetracycline were obtained.

Thus, the promotor P 756 was integrated with the immediate upstream of the tryptophan synthesizing gene on the chromosome by the homologous crossing-over to produce the targeted tryptophane producing strain. The results of the homologous crossing-over are illustrated as a model in Fig. 2.

Example 3. Preparation of plasmid containing promotor originating in phage SPD 2 and tryptophan synthesizing gene and introduction thereof into host (Fig. 3)

The starting plasmid pSDD 136 shown in Fig. 3 was a plasmid measuring 5 MD in size and containing 0.17 MD of the EcoR I fragment containing a promotor (P 201) originating in the Bacillus subtilis phase SPO 2, containing the restriction enzyme breaking point Bam II I, Sal I, and Pst I in the downstream thereof, and further containing the structural gene



of the chloramphenicol-resistant gene originating in *Bacillus pumilus* in the further downstream thereof. This plasmid was prepared from the chloramphenicol-resistant transformed particles obtained by digesting the pPL 708 (Gene, 16, 199 (1981)) (commercially procured from Bacillus Genetic Stock Center of Ohio State University) with the EcoR I and Bgl II, mixing the resultant product of digestion with the pBR 322 digested with EcoR I and Bam II I, subjecting the produced mixture to a ligation reaction with the T4 DNA ligase, and transforming the ligation product into an *escherichia coli* c600.

The plasmid pSDD 136 was digested with the restriction enzyme Bas II I and then treated with the Klenow fragment of the *escherichia coli* DNA polymerase. Meanwhile, the plasmid pSDT III was digested with the restriction enzyme EcoR I and then treated with the Klenow fragment of the *escherichia coli* DNA polymerase I. The two DNA fragments were mixed and ligated with the T4 DNA ligase. The product of this ligation was used to transform the tryptophan-demanding *escherichia coli* JA 221. By extracting and analyzing the plasmid from the resultant transformed particles demanding tryptophan and exhibiting resistance to ampicillin and chloramphenicol, the recombinant plasmid pSEY 1213 functionally ligating the promotor originating in the SPO 2 phase with the fragment containing the tryptophan synthesizing gene and measuring 10 MD in size was obtained.

This plasmid pSEY 1213 was used, in the same manner as

described in Example, to transform the competent cells of the tryptophan producing strain, bacillus SD-30, of the *Bacillus amyloliquefaciens*. Thus, the homologous crossing-over integrated the promotor P301 in the immediate upstream of the tryptophan synthesizing gene on the chromosome and produced the targeted tryptophan producing strain. The results of the homologous crossing-over are shown as a model in Fig. 3.

Example 4. Expression of tryptophan synthesizing enzymes

The amounts of the strain bacillus SD 1034 having the promotor sequence inserted in the neighborhood of the tryptophan gene on the microbial chromosome, the enzyme tryptophane synthetase produced by the bacillus SD 1035, and the anthranilic acid synthetase were found by measuring the two enzymes for activity.

The parent strain bacillus SD 30 having no promotor introduced therein, the strain bacillus SD 1034 having a promotor introduced therein, and the bacillus SD 1035 were precultured on the TBAB agar culture medium (Difco Corp.), inoculated in such amounts to the Spizizen minimum culture medium as to set the OD (660 nm) at an approximate level of 0.03, and shaken cultured till the OD (660 nm) at 37°C reached about 0.5. The resultant culture broth was cooled and centrifuged at 5000 rpm for 15 minutes. The precipitate was cleaned and centrifuged in the buffer-I (0.025M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.075 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.3, 0.01 M L-glutamin; 10% glycerin) and then suspended in 2 ml of the buffer-II (0.025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.075 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.3, 0.01 M L-glutamin, 4 mM NaCl; 40% glycerin).

The suspension and 0.5 mg of lysozyme and 5  $\mu$ g of DNase added thereto were incubated at 37°C for 30 minutes. The product of this incubation was centrifuged at 30,000 rpm for 30 minutes.

The supernatant consequently produced was used as a crude enzyme solution.

The results of the determination of tryptophan synthetase activity performed by following the method published in *Enzymology*, 5, 794 (1962) and the results of the determination of anthranilic acid synthetase activity performed by following the procedure published in *Genetics*, 52, 1303 (1965) are shown below.

Strain	Tryptophan synthetase <u>activity</u>	Anthranilic acid <u>synthetase</u>
SD30	100	100
SD1034	250	300
<u>SD1035</u>	<u>300</u>	<u>320</u>

In the bacillus SD 1034, the upstream portion of the tryptophan synthesizing gene containing the P 756 promoter and the anthranilic synthetase gene was introduced in the neighborhood of the tryptophan synthesizing gene on the chromosome of the host microbe and, as a result, the expression of the tryptophan synthesizing gene existing from the beginning on the chromosome was enhanced and the additional anthranilic acid synthetase gene was introduced as well. Thus, the tryptophan synthetase activity was amplified

to about 2.5 times the original level and the anthranilic acid synthetase activity to about 3.0 times the original level. In contrast, in the bacillus SD 1035, the diploid of the tryptophan synthesizing gene was formed and the P 201 promotor sequence DNA was introduced in the neighborhood of one of the halves of the diploid of the tryptophan synthesizing gene. As a result, the anthranilic acid synthetase activity and the tryptophane synthetase activity were each enhanced to 3 - 3.2 times the original level.

Example 5. Production of L-tryptophan

In 2 liters of the culture medium (pH 7.0) containing 5% glucose, 0.2% ammonium sulfate, 1.4%  $K_2PH_4$ , 0.6%  $KH_2PO_4$ , 1 g of sodium citrate·2H<sub>2</sub>O, 0.02%  $MgSO_4$ , 1 ppm of  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , and 1 ppm of  $MnSO_4$ , 800 ppm of anthranilic acid was placed and the parent strain bacillus 5030 having no promotor introduced therein, the strain bacillus SD 1034 having a promotor introduced therein, and the bacillus SD 1035 were inoculated.

The microbes thus prepared were shaken cultured aerobically in a jar fermenter, 5 liters in inner volume, at 35°C. During the course of the culture, the culture mixture was properly replenished with anthranilic acid to a concentration of about 1000 ppm each time the concentration thereof fell to below 50 ppm. The culture was continued for 15 hours, with the pH of the culture medium maintained in the range of  $7.0 \pm 0.4$  by adding 100 g of glucose and further adding the necessary amount of aqua ammonia while the culture was in progress. The amount of L-tryptophan accumulated in the culture broth was

traced by high-speed liquid chromatography. The results are shown below.

<u>Strain</u>	<u>Cumulative amount of L-tryptophan (g/L)</u>
SD30	4.7
SD1034	8.9
<u>SD1035</u>	<u>15.1</u>

It is clear from this table that the bacillus SD 1034 which had the expression of the tryptophan synthesizing gene on the chromosome enhanced by the introduction of the promotor of this invention accumulated tryptophan in an amount twice as large as the parent strain SD 30. The bacillus SD 1035 having an additional tryptophan synthesizing gene introduced therein besides the promotor accumulated tryptophan in an amount about three times as large as the parent strain SD 30.

#### Example 6

The fact that in the bacillus SD 1034 and the bacillus SD 1035, the promotor sequence DNA was introduced in the proximity of the tryptophane gene was confirmed by the Southern hybridization technique as follows.

The bacillus SD 1034 and the bacillus SD 1035 were shaken cultured overnight in 300 ml of culture medium at 35°C.

By the standard DNA extraction technique (Biochem. Biophys. Acta, 22, 619 (1963)), the chromosome DNA was extracted from the resultant culture broth and then refined, yield about 1 mg.

The portions, 1 µg each in amount, were thoroughly digested

severally with the restriction enzyme Bam H I, EcoR I, and Xba I and then subjected to agarose electrophoresis. The DNA samples thus obtained were each subjected to alkali modification and neutralization by the standard technique and transferred to a nitrocellulose filter. The filter was washed and then heat-treated at 80°C for two hours.

The EcoR I fragment of 5 MD containing a tryptophan gene separately prepared pure as a probe DNA, the Hind III fragment of 0.3 MD containing the P 756 promotor, and the EcoR I fragment of 0.18 MD containing the P 201 promotor were labelled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dCTP by the nick translation technique to furnish a probe DNA having a specific activity of 40  $\mu$  Ci/100 ng.

The filter mentioned above was incubated for two hours in a prehybridization solution (6  $\times$  SSC, 5  $\times$  Denhardt solution) at 42°C and then incubated overnight in a hybridization solution (6  $\times$  SSC, 2  $\times$  Denhardt solution) containing the probe DNA of 40  $\mu$  Ci and 50% formamide at 42°C.

Then, the filter was incubated twice each for 15 minutes in the buffer solution (2  $\times$  SSC) at 37°C, then transferred into a buffer solution (0.1  $\times$  SSC) of low concentration, and washed twice each for five minutes at 37°C. The filter was wiped to remove the residual moisture and then subjected to autoradiography using a film sold under the trademark of "Kodak XAR5" at -80°C for three hours.

As a result, in the case of the bacillus SD 1034, a signal was generated by the fragment probe containing the

tryptophan gene and by the fragment probe containing the P 756 as well in the area, 7 MD in size, digested by the Bam H I. Then, a signal was generated by the fragment probe containing the tryptophan gene and by the fragment probe containing the P 756 as well in the area, 3.2 MD in size, digested by the EcoR I. Further, a signal was generated by the fragment probe containing the tryptophan gene and by the fragment probe containing the P 756 as well in the area, 4.3 MD in size, digested by the Xba I. It was consequently confirmed that the construction of the bacillus SD 1034 in the neighborhood of the tryptophan gene was as shown in Fig. 2 and that the promotor sequence was introduced in the neighborhood of the tryptophan gene.

It was confirmed that in the case of the bacillus SD 1035, a signal was generated by the fragment probe containing the tryptophan gene and by the fragment probe containing the P 201 as well in the area, 10 MD in size, digested by the Xba I and the promotor sequence was introduced in the neighborhood of the tryptophan gene in consequence of the homologous crossing-over as shown in Fig. 3.

#### [Effect of the Invention]

The present invention, unlike the genetic amplification using a plasmid, enables a specific substance producible by a microorganism to be manufactured in large quantities on a commercial scale. While the genetic amplification fails to fulfill its object unless the target gene is in a perfect state, this invention fulfills its object easily so long as it

secures the upstream portion of the target gene and an arbitrary promotor DNA.

#### 4. Brief Description of the Drawings

Fig. 1 depicts a method for cloning a promotor sequence DNA.

Fig. 2 depicts the promotor sequence DNA and a method for introducing the upstream portion of the tryptophan gene into a microbe.

Fig. 3 depicts a method for producing a DNA having the tryptophan gene incorporated in the downstream of the promotor sequence and a method for the introduction in a microbe.



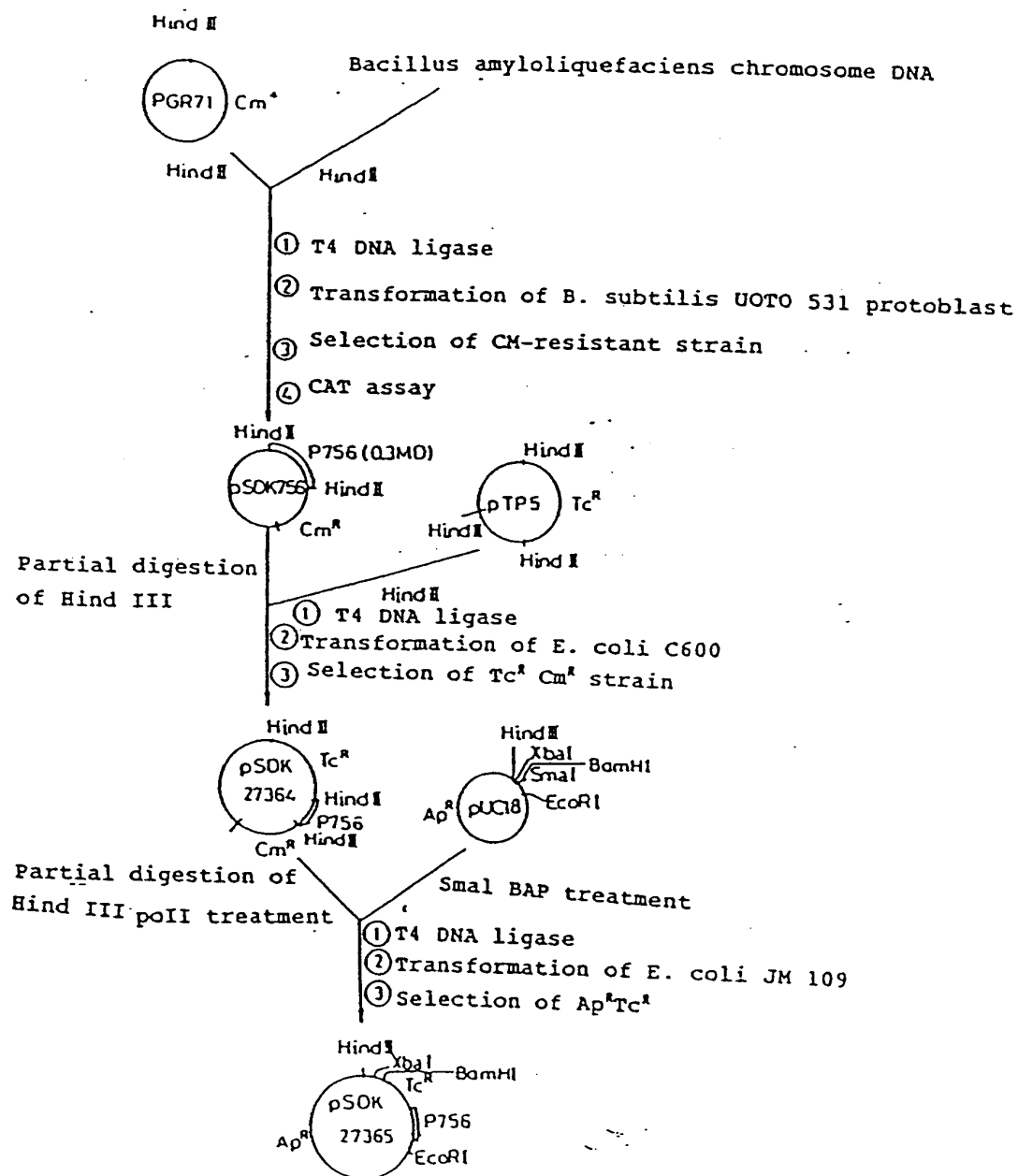
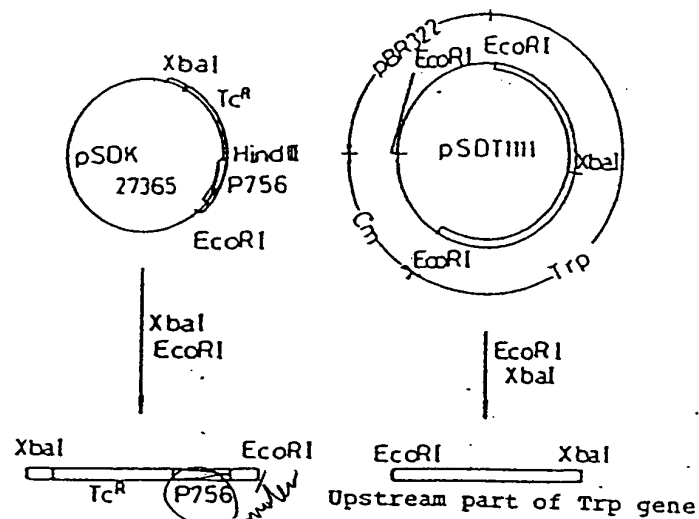


Fig. 1



- ① T4 DNA ligase
- ② Transformation of competent cells of SD 30 strain
- ③ Selection of Tc<sup>R</sup> strain

SD 1034 strain

Construction of SD 1034 in the neighborhood of tryptophan gene

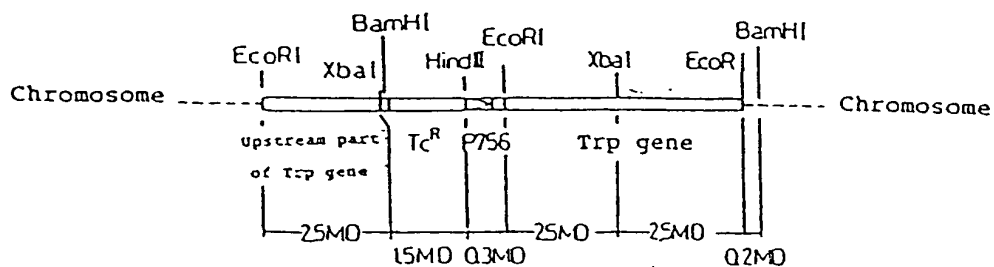
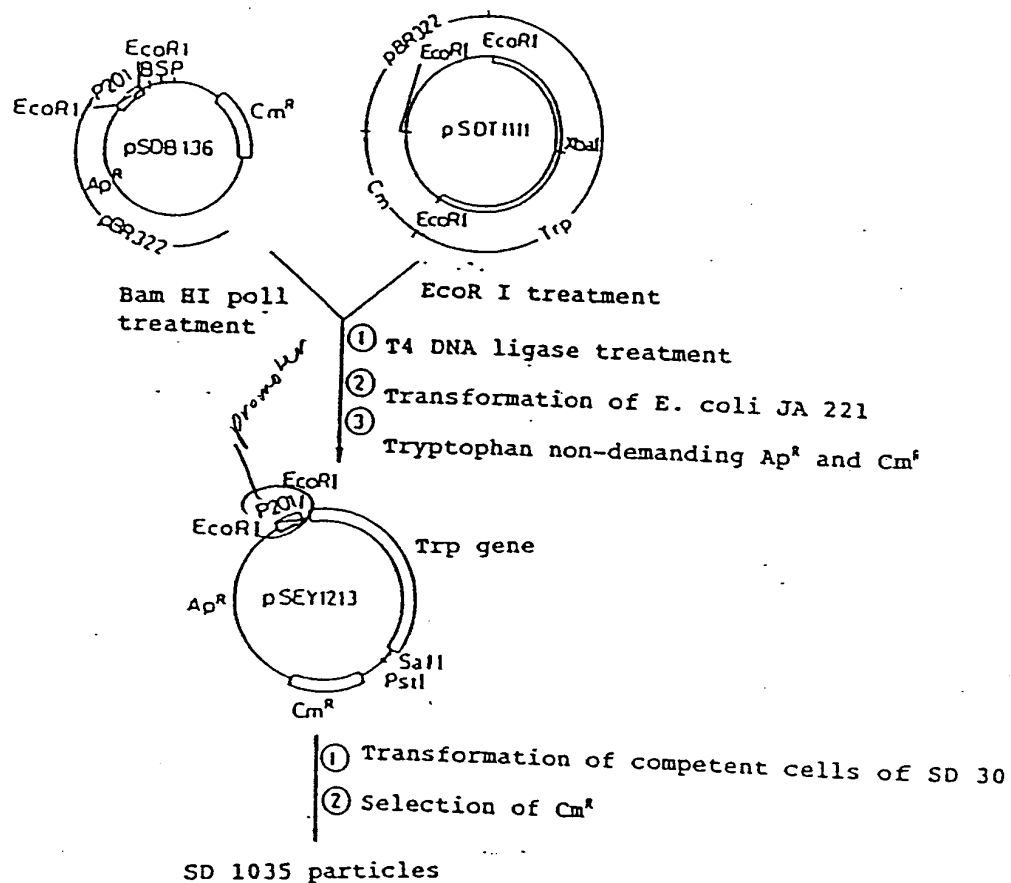


Fig. 2



Construction of SD 1035 in the neighborhood of tryptophan gene

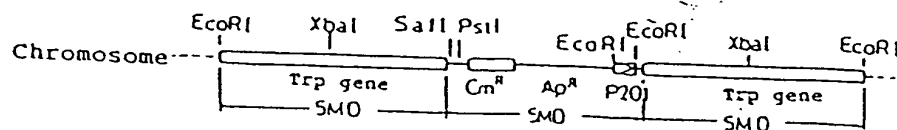


Fig. 3

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

## ⑪ 公開特許公報(A) 平1-215280

⑫ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)8月29日

C 12 N 1/20  
15/00  
C 12 P 13722G-8515-4B  
A-8412-4B  
A-7236-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全10頁)

⑭ 発明の名称 微生物の改良

⑮ 特 願 昭63-38482

⑯ 出 願 昭63(1988)2月23日

⑰ 発 明 者 崎 元 和 範 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社生化学研究所内

⑰ 発 明 者 高 橋 薫 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社生化学研究所内

⑰ 発 明 者 矢 島 善 博 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社生化学研究所内

⑰ 発 明 者 久 留 由 美 子 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社生化学研究所内

⑰ 出 願 人 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門2丁目10番12号

⑰ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外 4 名

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

微生物の改良

## 2. 特許請求の範囲

1. 目的物質の生産に係わる遺伝子を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該遺伝子のための発現制御配列が、該遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で導入されている改良された微生物。

2. 前記微生物がバチルス(Bacillus)属微生物である請求項1に記載の微生物。

3. 前記微生物がバチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)又はバチルス・アミロリクエファシエンス(Bacillus amyloliquefaciens)である請求項2に記載の微生物。

4. 前記発現制御配列がプロモーターであり、該プロモーターが前記遺伝子上流に挿入されている、請求項1～3のいずれか1項に記載の微生物。

5. 該プロモーターがバチルス属微生物のプロ

モーター又は、バチルス属微生物のファージのプロモーターであり、該プロモーターが前記遺伝子上流に挿入されている、請求項4に記載の微生物。

6. 前記遺伝子がトリプトファンの合成に係る遺伝子である請求項1～5のいずれか1項に記載の微生物。

7. 目的物質の生産に係わる遺伝子を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該遺伝子のための発現制御領域を、該遺伝子の発現を増強することができる位置及び方向で導入することを特徴とする改良された微生物の製造方法。

8. 特許請求の範囲第1項に記載の微生物を培養して該遺伝子に係わる生成物を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴とする有用物質の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は有用微生物の新しい改良方法及び該改良方法により製造された微生物、並びに該微生物

を用いる有用物質の製造方法に関する。本発明の微生物の改良方法は、既存の遺伝子を含有する染色体に、該遺伝子の発現を制御することができる発現制御配列を外部から導入することと特徴とする。

#### (従来の技術)

組換えDNA技術の発展、進歩によってホルモン、ワクチン、インターフェロン等の蛋白質や酵素、アミノ酸、さらにビタミンや抗生物質などの二次代謝産物に至るまで、微生物中で大量生産が可能となった。これは、物質生産に係わる特定の遺伝子を適当な多コピー数のプラスミドベクター上にクローン化し、該プラスミドを適当な微生物中に形質転換法で導入し、物質生産に係わる導入した遺伝子を発現させることにより達成される。この際、活性の高いプロモーター遺伝子を有するプラスミドベクターを用いて、プロモーター遺伝子と目的遺伝子を機能的に連結することにより、遺伝子の発現はより効率的に行われる。しかしな

がら、プラスミドの脱落が起こったり、プラスミドに変異や欠失が生じる等のため、プラスミドベクターを用いた物質生産は一般的に不安定であり安定的な物質生産には不適当なことがある。

これに代る方法として、宿主微生物の染色体に目的遺伝子をインテグレーションせしめる方法があり、この方法によれば外部から導入された遺伝子を多世代にわたって安定に維持することができるが、該遺伝子の増幅度を上げることが困難であり、このため目的とする生成物の生産性に限界があるという欠点が存在する。

#### (発明が解決しようとする課題)

従って、目的の物質に係る遺伝子が染色体中に安定に維持されており、しかも該遺伝子が強力に発現され、目的物質を効率よく生産することができる微生物及びその創成方法が強く求められている。

#### (課題を解決するための手段)

本発明者等は、上記の問題点を解決すべく種々検討した結果、特定の目的物質の生産に係わる遺伝子をすでに含有する微生物染色体に、該遺伝子の発現を増強することができる強力なプロモーターを導入することにより、目的物質を効率よく生産することができる微生物が得られることを見出し、この発明を完成した。

従って、本発明は、目的物質の生産に係わる遺伝子を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該遺伝子のための発現制御配列が、該遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で導入されている改良された微生物：該微生物の製造方法：並びに該微生物を培養して該遺伝子に係わる生成物を生産せしめ、そして該生成物を採取することと特徴とする有用物質の製造方法を提供しようとするものである。

#### (具体的な説明)

本発明は、目的物質の生産に係る遺伝子をすで

にその染色体中に有し該目的物質を生産することができる微生物、及び目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその染色体中に有するが該目的物質を実質上生産することができず新たに外部から発現制御遺伝子を導入することにより該目的物質を生産することができる様になる微生物、のいずれにも適用することができる。この様な微生物として、例えばバチルス(Bacillus)属、エシェリシア(Escherichia)属、セラチア(Serratia)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属等に属する微生物を挙げることができる。バチルス属に属する微生物の例として、例えばバチルス・ズブチリス、バチルス・アミロリクエファシエンス、バチルス・リケニホルミス、バチルス・ステアロサーモフィラス等を挙げることができる。

本発明の方法により製造される目的物質は、遺伝子の直接的な発現生成物である蛋白質又はポリペプチド、例えば各種の酵素類、例えばアロテア

ーゼ、アミラーゼ、グルコースイソメラーゼ、セルラーゼ、トリプトファンシンセターゼ；各種のペプチド性ホルモン類、例えばインシュリン、成長ホルモン、エンケファリン、ソマトスタチン；各種の抗原類、例えば肝炎ワクチン、ポリオワクチン、ヘルペスワクチン；各種のリンホカイン類、例えばインターフェロン、インターロイキン等であることができる。

本発明の方法により製造される目的物質はまた、遺伝子の直接的発現生成物である1又は複数の酵素の触媒作用により生産される物質であることができる。この様な物質の例として複数のトリプトファン合成関連酵素により合成されるL-トリプトファン、複数のスレオニン合成関連酵素により合成されるL-スレオニン、複数のプリンヌクレオチド合成酵素により合成されるイノシンやグアニン等を挙げることができる。この様な目的物質の生産に係わる遺伝子としては、宿主微生物の染色体中に本来存在する遺伝子であってもよく、又あらかじめ宿主微生物の染色体中に人為的に挿入

しておいた遺伝子であってもよい。前者の遺伝子はその遺伝子に天然に付随する発現制御配列を有しており、これに加えて本発明の方法により追加の発現制御配列を挿入することにより、宿主による目的物質の生産を増強することができ、あるいはもともと目的物質を実質的に生産しなかった宿主に目的物質を生産する能力を付与することができる。後者の場合も、多くの場合その構造遺伝子に付随する発現制御領域を有しており、本発明の方法による強力な発現制御配列を導入することにより、前記のごとき効果を得ることができる。あらかじめ挿入された遺伝子とその発現制御配列を伴っていない場合には、そのままでは宿主微生物は目的物質を生産することができないが、本発明の方法により発現制御配列を人為的に挿入することにより該宿主微生物に目的物質を生産する能力を付与することができる。この様な遺伝子を含む微生物の具体例として、枯草菌類のトリプトファン合成に係わる遺伝子とクロラムフェニコール耐性遺伝子を試験管内でライゲーションせしめ、

トリプトファン生産菌である枯草菌類の染色体中に両遺伝子をインテグレーションさせることにより創製された、安定的に両遺伝子産物及びトリプトファンを生産する微生物が挙げられる（特開昭61-85184、及び特開昭61-88873）。

発現制御配列としては例えばプロモーター、ターミネーター、SD配列、オペレーターが挙げられ、これらは特定の発現制御配列に依存して通常は染色体にあらかじめ存在する。目的物質の生産に係わる構造遺伝子の上流又は下流に、該構造遺伝子の転写方向に合わせて挿入される。前記制御配列の典型的な例はプロモーターであり、これは一般に前記構造遺伝子の上流に該構造遺伝子の転写方向に合わせて挿入される。例えば、ある特定の宿主微生物については、該微生物中に天然に存在するプロモーターをクローン化したもの、又は該微生物のファージ中に天然に存在するプロモーターをクローン化したもの、あるいはこれらのプロモーターに由来するハイブリッドプロモーター等を使用することができる。プロモーターはまた、

化学合成されたものであってもよい。

挿入すべき発現制御領域は通常、宿主微生物中で増幅することができるプラスミドにより、あるいは宿主微生物中で増幅することができない環状又は線状のDNAとして導入される。目的とするDNAを宿主微生物に導入するための方法として、DNAを細胞に挿入するために通常用いられる方法のいずれか、例えばカルシウムセル法（文献J. Bacteriol. 119, 1072 (1974)）、コンピテントセル法（文献Gene. 1, 153 (1977)）、プロトプラスト形成転換法（Molec. Gen. Genet. 168, 111 (1979)）等を用いることができる。

プロモーター等の発現制御配列を宿主微生物の染色体にインテグレーションする方法としては一般に、いわゆる相対的交叉が用いられる。このため、挿入されるべき制御配列はその一端又は両端に、染色体にすでに存在している目的生成物の生産に係わる遺伝子のDNA配列と相同なDNA配列を有することが好ましい。

本明細書においては、具体例として、宿主微生物

物としてバチルス・アミロリクエファシエンスを用い、目的物質の生産に係わる遺伝子としてトリプトファンオペロンを構成する遺伝子を用い、発現制御配列としてバチルス・アミロリクエファシエンス由来のプロモーター又はバチルス・ズブチリスに感染するSP02ファージ由来のプロモーターを用いる。以下に、この具体例を実施例として記載する。

なお、実施例において酵素反応条件はおよそ次の通りとした。

**HindIII 消化** 反応媒体: 100mM Tris-HCl(pH7.5),  
50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>,  
酵素量 : DNA 1  $\mu$ g に対して  
5ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

**HindIII 部分消化**

反応媒体: 100mM Tris-HCl(pH7.5),  
50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>,

酵素量 : DNA 1  $\mu$ g に対して  
0.1ユニット~1ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

**DNAポリメラーゼI**

**Klenowフラグメント**

(pol I) 処理 100mM Tris-HCl(pH7.5), 50mM  
NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>の緩衝液中で消化された1  $\mu$ gのDNA (20  $\mu$ l) に対して、DNAポリメラーゼI-Klenowフラグメントを3ユニット(1  $\mu$ l)、各 dXTP 2  $\mu$ mol (2 mM 溶液を1  $\mu$ l) 加え、室温で30分間インキュベーションする。

**細菌アルカリ性ホス**

**ファーターゼ(BAP)**

処理 制限酵素で消化された1  $\mu$ g DNA溶液に対して0.3ユニットのBAPを加え、55℃、30分間インキュベーションする。

反応条件: 37℃にて60分間

**SmaI 消化** 反応媒体: 10mM Tris-HCl(pH8.0),  
20mM KCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>,

酵素量 : DNA 1  $\mu$ g に対して  
10ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

**XbaI 消化** 反応条件: 100mM Tris-HCl(pH7.5),  
50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>,

酵素量 : DNA 1  $\mu$ g に対して  
5ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

**EcoRI 消化** 反応媒体: 100mM Tris-HCl(pH7.5),  
50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>,

酵素量 : DNA 1  $\mu$ g に対して  
5ユニット

反応条件: 37℃にて60分間

**BamHI 消化** 反応媒体: 100mM Tris-HCl(pH7.5),  
50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>,

酵素量 : DNA 1  $\mu$ g に対して  
10ユニット

**T4 DNAリガーゼ**

による連結 100mM Tris-HCl(pH7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>中で消化された各DNA溶液を混合後、100  $\mu$ Mになる様にATPを加え、さらにT4 DNAリガーゼを30ユニット添加し、15℃で1夜インキュベーションする。

**実施例1. バチルス・アミロリクエファシエンスからのプロモーターのクローニング及びマーカーの付与(第1図)**

まず、プロモーター検索ベクター-pGR71 (Nature, 293, 309(1981), Goldfarb, D.S. et al.) (このベクターは当業界において広く使用されており、容易に入手することができる。)を制限酵素HindIIIで消化し、これと同じく制限酵素HindIIIで消化したバチルス・アミロリクエファシエンスIAM 1521の染色体DNAとを試験管内で混合し、T4 DNAリガーゼを用いて連結反応を行った後、バチルス・ズブチリスUOT 0531 (東京大学応用微生物研究所)

にプロトプラスト形質転換法(S.Chang & S.H. Cohen, Molec. gen. Genet. 168, 111(1979))で導入し、25 ppmのクロラムフェニコールを含む寒天プレートに生える形質転換体を多数取得した。次にこの形質転換体のクロラムフェニコール耐性およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの活性を測定し、活性が一番高い形質転換体バチルス・ズブチリスTFK756を高活性プロモーターがクローン化されている株として選んだ。TFK756からプラスミドを分離・精製し、クローン化されていた0.3MDの大きさのHindⅢ断片DNAをプロモーター活性を有する配列P756と命名。P756がクローン化されたpCR 71をpSDK 756と命名した。

次にpSDK 756のP756プロモーターの上流にマーカーとしてのテトラサイクリン耐性遺伝子を組み込むために枯草菌プラスミドpTP5を制限酵素HindⅢで消化し、これと同じく制限酵素HindⅢで部分消化したpSDK 756とを混合し、T4 DNAリガーゼを用いて結合反応を行った後、大腸菌C600に形質転換を

行い、テトラサイクリン耐性で、かつクロラムフェニコール耐性となる形質転換体を得た。これによりpSDK 756のP756上流に1.5MDのテトラサイクリン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドpSDK27364を作製した。

さらに図1に示したようにまずpSDK 27364を制限酵素HindⅢで部分消化し、Klenow Fragmentと4種のXTPを用いて、平滑末端を作った。次に、SalIで消化しBAPで脱リン酸化したpUC 18と混合し、T4 DNAリガーゼを用いて結合反応を行い、大腸菌JM 109に形質転換を行い、プラスミドpSDK 27365を含む、アンピシリン、テトラサイクリン耐性を示す形質転換体をスクリーニングした。これにより、テトラサイクリン耐性のマーカーが付与されたP756を有するDNA断片の調製ができるプラスミドが取得された。

#### 実施例2. プロモーターP756導入用DNAの調製 及び宿主株への導入(第2図)

前記プラスミドpSDK 27365をEcoRI及びXbaIで消化、アガロース電気泳動により分離し、フェ

ノール抽出及びエタノール沈澱により精製することにより、テトラサイクリン耐性遺伝子及びプロモーターP756を含有する1.8MDのEcoRI-XbaI断片を調製した。

一方、バチルス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン合成系遺伝子が、大腸菌プラスミドpBR322にクローニングされているプラスミドpSOT1111を制限酵素EcoRI及びXbaIで消化し、アガロースゲル電気泳動により分離し、そしてフェノール抽出及びエタノール沈澱により精製することにより、トリプトファン合成系遺伝子上流部分を含有する2.5MDの大きさのEcoRI-XbaIフラグメントを得た。なお、前記プラスミドpSOT1111を含有する大腸菌は、工業技術院微生物工業技術研究所に蔵工研菌第7861号(FERMP-7861)として寄託されている。

次に、両フラグメント約1μgずつを混合し、T4 DNAリガーゼを用いて連結反応を行い、これを用いてバチルス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン生産株バチルスSD30のコンピテント

セルを次の様にして形質転換した。

まず、TBAB寒天培地(Difco社、Bacto Tryptose 10g, Bacto Beef Extract 3g, NaCl 5g, Bacto Agar 15g; H<sub>2</sub>O 1ℓ)で菌液培養したバチルスSD30をCⅠ培地(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, クエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O 1g, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 5g, グルコース 5g, カザミノ酸 0.2g, レートリプトファン 50ppm, H<sub>2</sub>O 1ℓ)に0.05になる様に接種、37℃で振とう培養し、0.0660が約0.5になった時点で遠心分離(4000rpm, 10分間)し、沈澱をCⅡ培地(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g, クエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>O 1g, MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 5g, グルコース 5g, カザミノ酸 0.1g, レートリプトファン 50ppm)で、2倍に希釈されるように懸濁した。さらに37℃で振とう培養を続け、30分後に、連結反応を行なったDNA溶液を加え、37℃で振とうを1時間行ない、テトラサイクリンを5ppm含むTBAB寒天培地に塗布した。

37℃で1夜培養後に、テトラサイクリン耐性の



形質転換体が取得された。

この様に、相同的交叉によりプロモーター P756が染色体上のトリプトファン合成系遺伝子のすぐ上流にインテグレーションされ、目的とするトリプトファン生産株が得られた。この相同的交叉の結果を第2図に模式的に示す。

**実施例3. フェージSP02由来のプロモーターとトリプトファン合成系遺伝子を含むアプラスミドの調製及びその宿主への導入(第3図)**

第3図に示す出発アプラスミド pSD8 136は、枯草菌フェージSP02由来のプロモーター(P201)を含む0.17MDのEcoRIフラグメントを含有し、その下流に制限酵素切断点BamHI、SalI及びPstIを含み、さらにその下流にバチルス・アミリス(*Bacillus pasteurii*)由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子の構造遺伝子を含む5MDの大きさのアプラスミドである。該アプラスミドはpPL708(Gene, 16,199(1981))(Bacillus Genetic Stock Center, オハイオ・ステート・ユニバーシティーから商業

的に入手することができる。)をEcoRIとBglIIで消化し、EcoRIとBamHIで消化したpBR322と混合、T4 DNAリガーゼで結合反応後、大腸菌c600に形質転換を行ない、得られたクロラムフェニコール耐性の形質転換体から調製される。

アプラスミド pSD8 136を制限酵素BamHIで消化し、次に大腸菌DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで処理した。他方、アプラスミド pSDT 111を制限酵素EcoRIで消化し、次に大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントで処理した。両DNA断片を混合した後、T4 DNAリガーゼにより連結し、この生成物を用いてトリプトファン要求性大腸菌JA 221を形質転換した。得られたトリプトファン非要求性、アンピシリン耐性でかつクロラムフェニコール耐性の形質転換体よりアプラスミドを抽出、分析してSP02フェージ由来プロモーターとトリプトファン合成系遺伝子を含むフラグメントが遺伝的に連結している大きさ1.0MDの組換えアプラスミド pSEY1213が得られた。

このアプラスミド pSEY1213を用い、実施例1に記

載したのと同様にしてバチルス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン生産株バチルスSD-30のコンピテントセルを形質転換した。こうして、相同的交叉によりプロモーターP201が染色体上のトリプトファン合成系遺伝子のすぐ上流にインテグレーションされ、目的とするトリプトファン生産株が得られた。この相同的交叉の結果を第3図に模式的に示す。

**実施例4. トリプトファン合成系酵素の発現**

細菌染色体上のトリプトファン遺伝子近傍に、プロモーター配列を導入した菌株バチルスSD1034、及びバチルスSD1035の生産する酵素トリプトファンシンターゼおよびアントラニール酸シンターゼの量を両酵素の活性測定により測った。

プロモーターの導入されていない菌株バチルスSD30、並びにプロモーターが導入されている株バチルスSD1034、及びバチルスSD1035をTBAB寒天培地(Difco社)で前培養し、Spizizen最少培地 100 mlにOD(660nm)が約0.03になるように接種し、37℃でOD(660nm)が約0.5になるまで養う

培養した。5000rpm、15分間冷却遠心を行い、沈澱をバッファーI(0.025M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.075M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 7.3、0.01M L-グルタミン、1.0%グリセリン)で洗浄遠心後、2mlのバッファーII(0.025M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.075M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、pH 7.3、0.01M L-グルタミン、4mM NaCl、4.0%グリセリン)に懸濁した。リゾチーム 0.5mg、DNase 5μg添加し、37℃で30分間インキュベーションした。30,000rpmで30分間遠心し上清を粗酵素液とした。

Method in Enzymology, 5, 794(1962)に従って行ったトリプトファンシンターゼ活性測定の結果、およびGenetics, 52, 1303(1965)に従って行ったアントラニール酸シンターゼ活性測定の結果を示す。

菌株	トリプトファン シンターゼ活性	アントラニール 酸シンターゼ
SD30	100	100
SD1034	250	300
SD1035	300	320

バチルスSD1034においては、P756プロモーター及びアントラニル酸シンセターゼ遺伝子を含むトリプトファン合成系遺伝子の上位部分が宿主細胞の染色体上のトリプトファン合成系遺伝子の近傍に導入されており、この結果として染色体上に元から存在したトリプトファン合成系の遺伝子の発現が強化されていると共に、追加のアントラニル酸シンセターゼ遺伝子が導入されている。このため、トリプトファンシンセターゼ活性が約2.5倍に増強され、アントラニル酸シンセターゼ活性は約3.0倍に増強された。他方、バチルスSD1035においては、トリプトファン合成系遺伝子の2倍体が形成されており、さらにその片方のトリプトファン合成系遺伝子近傍にP201プロモーター配列DNAが導入されていることにより、アントラニル酸シンセターゼ活性、及びトリプトファンシンセターゼ活性が3~3.2倍増強された。

#### 実施例5. L-トリプトファンの製造

グルコース5%、炭素 0.2%、 $K_2HPO_4$  1.4%、 $KH_2PO_4$  0.6%、クエン酸ナトリウム・ $2H_2O$  1g、

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1ppm、 $MnSO_4$  1ppmを含む培地(pH 7.0)2Lにアントラニル酸800ppmを添加し、これにプロモーターの導入されていない親株バチルスSD30、並びにプロモーターが導入された株バチルスSD1034、及びバチルスSD1035を接種し、35℃で5Lのジャーファメンターで通気攪はん培養した。培養中、アントラニル酸濃度が50ppm以下まで減少した時点でアントラニル酸濃度が約1000ppmになるように適宜追加添加し、また培養途中グルコースを100g追加し、更にアンモニア水の添加により培地のpHを7.0±0.4に保ちながら15時間培養した。培養液中に蓄積されたL-トリプトファンの量を高濃度液体クロマトグラフィーにより測定した結果を下に示す。

菌 株	L-トリプトファン蓄積(g/L)
SD30	4.7
SD1034	8.9
SD1035	15.1

上の表から明らかな様に、本発明のプロモーターの導入によって染色体上のトリプトファン合成系遺伝子の発現が増強されたバチルスSD1034は親株SD30に比べて約2倍のトリプトファンを蓄積した。他方、プロモーターのほかに追加のトリプトファン合成系遺伝子が導入されたバチルスSD1035は親株SD30に比べて約3倍のトリプトファンを蓄積した。

#### 実施例6.

バチルスSD1034、及びバチルスSD1035に於いてプロモーター配列DNAがトリプトファン遺伝子の近傍に導入されていることは次の様なサザンハイブリダイゼーション法により確認した。

バチルスSD1034、及びバチルスSD1035を1培地300mlで35℃、1夜振とう培養して、通常のDNA抽出法(Biochem. Biophys. Acta 72, 619, (1963))により染色体DNAを抽出・精製し約1mgを得た。各DNA1μgずつを制限酵素BamHI、EcoRI、IbaIで完全に消化し、アガロース電気泳動を行った。常法に従ってアルカリ変性、

中和後、ニトロセルロースフィルターにDNAをトランスファーした。フィルターを洗浄後、80℃で2時間熱処理した。

プローブDNAとして別に精製したトリプトファン遺伝子を含む5MDのEcoRIフラグメントとP756プロモーターを含む0.3MDのHindIIIフラグメントとP201プロモーターを含む0.18MDのEcoRIフラグメントをニクトランスレーション法により( $\gamma$ - $^{32}P$ ) dCTPでラベルして比活性40μCi/100ngのプローブDNAを作製した。

前述のフィルターをプレハイブリダイゼーション溶液(6×SSC、5×デンハルト溶液中で42℃で2時間インキュベーションの後40μCiのプローブDNAと50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液(6×SSC、2×デンハルト溶液中で42℃1夜インキュベーションした。次にフィルターを2回、37℃で15分間緩衝液(2×SSC)中でインキュベーションし低塩濃度の緩衝液(0.1×SSC)に移し、2回、37℃で5分間洗浄した。フィルターの水分を拭きと

リコダック XAR5フィルムを用いて-80℃で3時間オートラジオグラフィーを行った。

その結果、バチルスSD1034の場合、BamHIで消化した7MDの大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブでも、P756を含むフラグメントプローブでもシグナルが生じた。又、EcoRIで消化した4.3MDの大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブでもP756を含むフラグメントプローブでもシグナルが生じ、更にXbaIで消化した4.3MDの大きさ付近にもトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブでもP756を含むフラグメントプローブでもシグナルが生じた。従ってバチルスSD1034のトリプトファン遺伝子付近の構造は第2図のようであり、プロモーター配列がトリプトファン遺伝子の近傍に導入されていることが確認された。

バチルスSD1035の場合、XbaIで消化した10MDの大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブでもP201を含むフラグメントプローブでもシグナルが生じ、相対的交叉の結果、

第3図に示すように、プロモーター配列がトリプトファン遺伝子の近傍に導入されていることが確認された。

#### (本発明の効果)

本発明に従えば、プラスミドを用いた遺伝子増幅と異なり、安定的に微生物の生産する特定の物質を多量に工業的に生産することが可能となる。さらに遺伝子増幅に於いては、目的の遺伝子が完全無傷でないとその目的を達成することができないが、本発明では目的遺伝子の上流部分と任意のプロモーターDNAさえあれば、簡単にその目的が達成される。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、プロモーター配列DNAのクローニング方法を示す。

第2図は、プロモーター配列DNAとトリプトファン遺伝子上流部分の細菌への導入方法を示す。

第3図は、プロモーター配列下流へトリプトファン遺伝子が組み込まれたDNAの調製法、及び

細菌への導入方法を示す。

#### 特許出願人

昭和電工 株式会社

#### 特許出願代理人

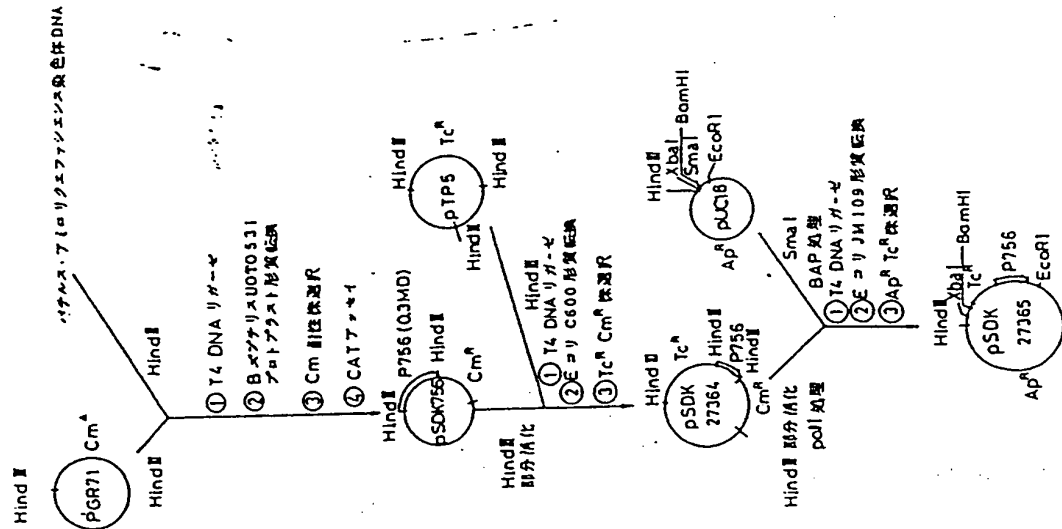
弁理士 齊 木 朗

弁理士 石 田 敬

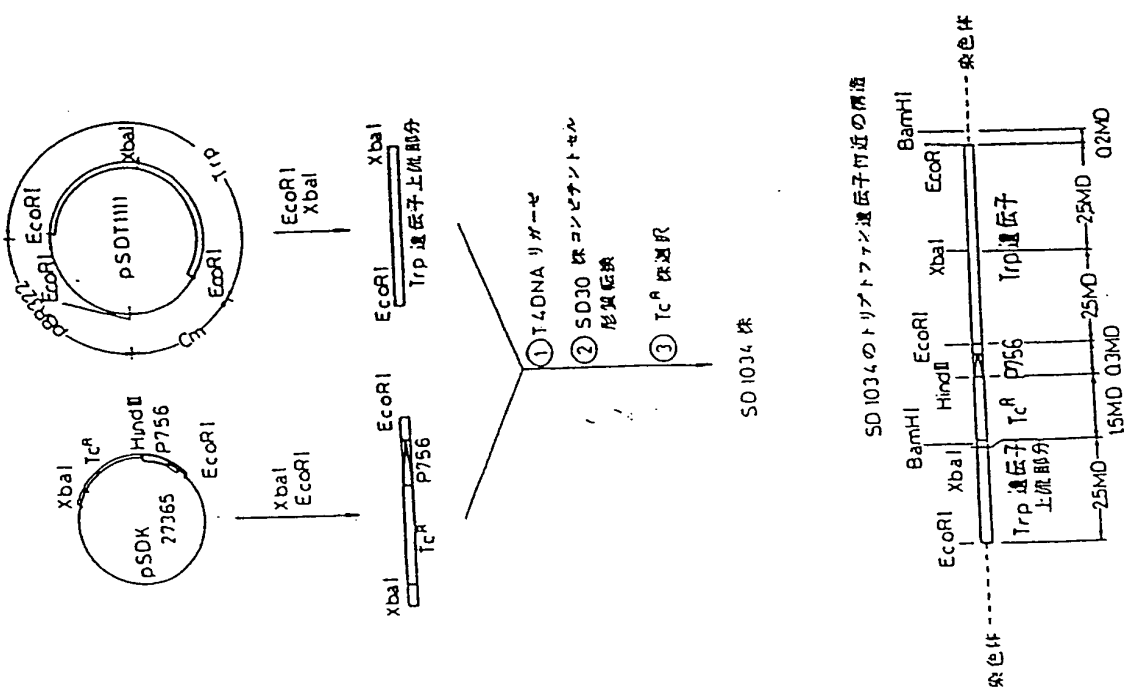
弁理士 橋 本 徹

弁理士 山 口 昭 之

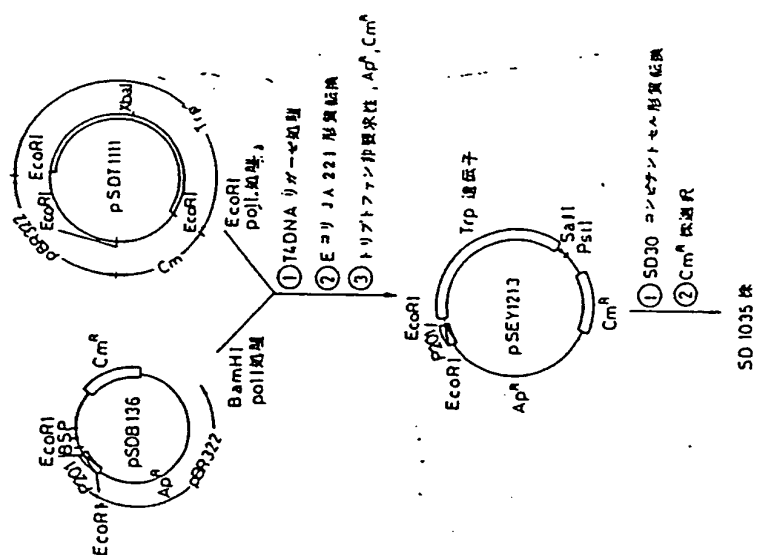
弁理士 西 山 雅 也



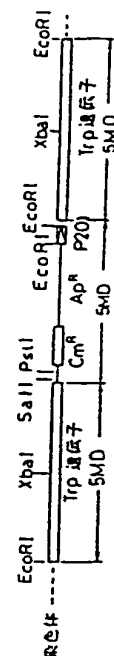
第 1 図



第 2 図



SD 1035 のトリプトファン濃度分布の測定



第 3 图

第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>4</sup>

識別記号

厅内整理番号

//C	12	N	1/20
C	12	R	1:125)
(C	12	N	1/20
C	12	R	1:07)
(C	12	P	13/22
C	12	R	1:125)
C	12	P	13/22
C	12	R	1:07)

A-

A—